



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0020450

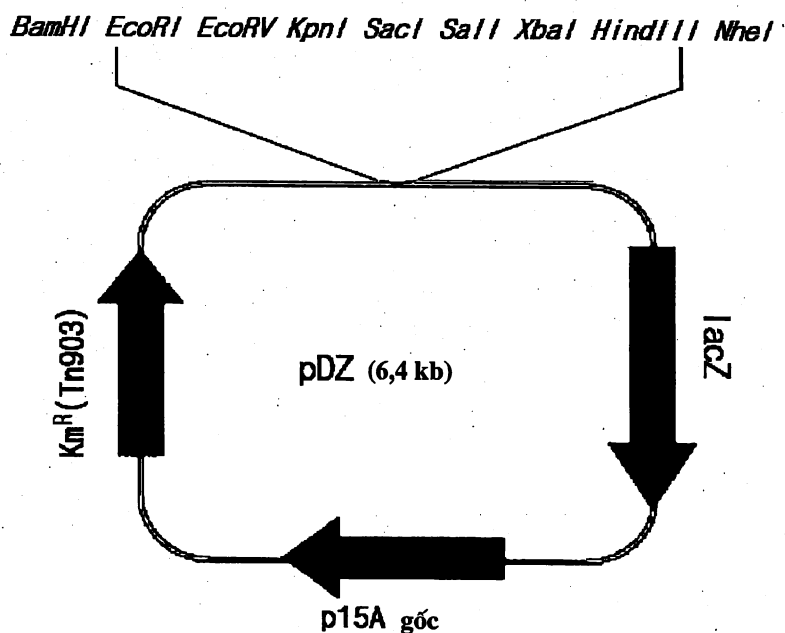
(51)⁷ **C12N 1/21, C12P 19/00**

(13) **B**

-
- (21) 1-2011-02796 (22) 23.03.2010
(86) PCT/KR2010/001760 23.03.2010 (87) WO2010/114245 07.10.2010
(30) 10-2009-0028145 01.04.2009 KR
(45) 25.02.2019 371 (43) 27.02.2012 287
(73) CJ CHEILJEDANG CORP. (KR)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea
(72) KIM Jeong Hwan (KR), KWON Jung Gun (KR), AHN Tae Min (KR), HWANG Soo
Youn (KR), BAEK Min Ji (KR), KWON Na Ra (KR), YOON Nan Young (KR),
KIM Ju Jeong (KR)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) **VI SINH VẬT THUỘC GIỐNG CORYNEBACTERIUM SẢN XUẤT AXIT 5'-INOSINIC VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT 5'-INOSINIC**

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó sự biểu hiện của các gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* với hiệu suất axit 5'-inosinic tăng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó sự biểu hiện của các gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, và phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* với hiệu suất axit 5'-inosinic tăng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một trong số hợp chất nucleotit, axit 5'-inosinic là nguyên liệu trung gian của hệ trao đổi chất của sự sinh tổng hợp nucleotit, được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, thuốc và các lĩnh vực được khác nhau và đóng vai trò quan trọng trong sinh lý học động vật và thực vật. Cụ thể, axit 5'-inosinic là gia vị nucleotit, loại gia vị này đã thu hút

được rất nhiều sự chú ý khi dùng làm gia vị cho các món ăn, bởi vì nó có tác dụng hiệp đồng khi được sử dụng với mononatri glutamat (MSG).

Đã biết quy trình sản xuất axit 5'-inosinic bao gồm quy trình phân hủy bằng enzym axit ribonucleic được chiết từ các tế bào nấm men (Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 1614/1957, v.v.), quy trình phosphoryl hóa hóa học inosin được tạo ra bởi sự lên men (Agric. Biol. Chem., 36, 1511(1972), v.v.) và quy trình nuôi cấy vi sinh vật có khả năng sản xuất axit 5'-inosinic và thu hồi inosin monophosphat (IMP) tích lũy trong môi trường. Hiện nay, chủ yếu vẫn sử dụng các quy trình sản xuất axit 5'-inosinic bằng cách sử dụng vi sinh vật. Chúng thuộc giống *Corynebacterium* được sử dụng rộng rãi làm vi sinh vật để sản xuất axit 5'-inosinic, và ví dụ, phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic bằng cách nuôi cấy *Corynebacterium ammoniagenes* được mô tả (Công bố patent Hàn Quốc số 2003-0042972).

Để cải thiện hiệu suất sản phẩm axit 5'-inosinic thu được bởi vi sinh vật, các nghiên cứu đã được thực hiện để phát triển chủng bằng cách làm tăng hoặc làm giảm hoạt tính hoặc sự biểu hiện của các enzym liên quan đến con đường sinh tổng hợp hoặc suy biến axit 5'-inosinic. Patent Hàn Quốc số 785248 mô tả vi sinh vật, mà trong đó gen *purC* mã hóa phosphoribosylaminoimidazol sucxinocarboxamit

synthetaza được biểu hiện quá mức trong con đường sinh tổng hợp purin và phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic bằng cách sử dụng chúng. Ngoài ra, patent Hàn Quốc số 857379 mô tả chủng *Corynebacterium ammoniagenes*, mà trong đó *purKE* mã hóa phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza được biểu hiện quá mức và phương pháp sản xuất IMP nồng độ cao với hiệu suất cao bằng cách sử dụng chúng.

Tuy nhiên, vẫn cần phát triển chủng có khả năng sản xuất axit 5'-inosinic với hiệu suất cao hơn và phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic bằng cách sử dụng chúng.

Vì vậy, các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu để phát triển chủng có khả năng sản xuất axit 5'-inosinic với hiệu suất cao. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng hiệu suất axit 5'-inosinic có thể được cải thiện bằng cách làm tăng đồng thời hoạt tính của các enzym chính liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin cao hơn so với hoạt tính nội sinh, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện.

Mục đích khác của sáng chế là nhằm tạo ra phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic bằng cách sử dụng vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện vectơ pDZ để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*;

Fig. 2 thể hiện vectơ pDZ-2purFM để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*;

Fig. 3 thể hiện vectơ pDZ-2purNH để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*;

Fig. 4 thể hiện vectơ pDZ-2purSL để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*;

Fig. 5 thể hiện vectơ pDZ-2purKE để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*;

Fig. 6 thể hiện vectơ pDZ-2purC để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*; và

Fig. 7 thể hiện vectơ pDZ-2prs để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó sự biểu hiện của các gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh.

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* theo sáng chế có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện hơn so với chủng cha mẹ, bởi vì sự biểu hiện của các gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin” nghĩa là enzym xúc tác phản ứng liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin sản xuất cơ chất purin ở dạng sản phẩm cuối, và bao gồm phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza, phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II, phosphoribosylaminoimidazol synthetaza, phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza, phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza, axit inosinic xyclohydrolaza, ribozaphosphat pyrophosphokinaza hoặc các chất tương tự.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin có thể là tổ hợp của một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm bao gồm phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza, phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II, phosphoribosylaminoimidazol synthetaza, phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza, phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza và axit inosinic xyclohydrolaza, và ribozaphosphat pyrophosphokinaza.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin, mà sự biểu hiện của nó được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, là tổ hợp của gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purKE mã hóa phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40, gen purC mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen purH mã hóa axit inosinic

xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42, và gen prs mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin, mà sự biểu hiện của nó được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, là tổ hợp của gen purF mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 35, gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purM mã hóa phosphoribosylaminoimidazol synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 39, gen purKE mã hóa phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40, gen purC mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen purH mã hóa axit inosinic xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42, và gen prs mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh” có nghĩa là mức biểu hiện của gen cao hơn so với mức được biểu hiện trong tự nhiên ở vi sinh vật hoặc cao hơn so với mức được biểu hiện ở chủng cha mẹ, và bao gồm tăng về số lượng (số bản sao) gen mã hóa enzym tương ứng và nhờ đó mức biểu hiện được tăng lên hoặc tăng mức biểu hiện nhờ đột biến hoặc tăng mức biểu hiện nhờ cả tăng số lượng gen lẫn đột biến.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, việc tăng mức biểu hiện của gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin bao gồm tăng số bản sao của gen bằng cách đưa bổ sung gen ngoại lai tương ứng vào chủng hoặc bằng cách khuếch đại gen nội sinh, hoặc tăng hiệu suất phiên mã hoặc hiệu suất dịch mã nhờ đột biến trong trình tự điều chỉnh phiên mã hoặc dịch mã, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Sự khuếch đại gen nội sinh có thể được thực hiện một cách dễ dàng bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách nuôi cấy trong điều kiện áp suất chọn lọc thích hợp.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, mức biểu hiện của gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin có thể được tăng lên bằng cách đưa bổ sung gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình

sinh tổng hợp purin vào tế bào hoặc bằng cách khuếch đại gen nội sinh mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin, mà mức biểu hiện của nó được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, có thể có mặt dưới dạng hai hoặc nhiều bản sao ở vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện bằng cách đưa một hoặc nhiều bản sao vào tế bào, ngoài gen nội sinh tương ứng.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được đưa vào vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện bằng cách biến nạp bằng cách sử dụng vector tái tổ hợp chứa hai bản sao của gen tương ứng được sắp xếp liên tiếp.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vector tái tổ hợp được sử dụng để tạo ra vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vector tái tổ hợp pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, và pDZ-2prs, có các bản đồ phân cắt lần lượt từ FIG. 2 đến 7 tùy thuộc vào gen được đưa vào.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể có nguồn gốc từ vi sinh vật *Corynebacterium* có khả năng sản xuất axit 5'-inosinic. Ví dụ, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872, *Corynebacterium rmoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 và chủng được tạo ra từ đó.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể bao gồm hai hoặc nhiều bản sao của gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể là *Corynebacterium ammoniagenes*, và tốt hơn nữa là *Corynebacterium ammoniagenes* được biến nạp, trong đó hoạt tính của tổ hợp của gen *prs* và một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm *purF*, *purN*, *purS*, *purL*, *purM*, *purKE*, *purC*, và *purH* tăng để tạo ra axit 5'-inosinic có nồng độ cao.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể là chủng, trong đó chủng *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) sản xuất axit 5'-inosinic được đưa vào với mỗi vectơ trong số các vectơ tái tổ hợp pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, và pDZ-2prs có các bản đồ phân cắt trên FIG. 2, 3, 4, 5, 6, và 7 theo thứ tự hoặc ở dạng tổ hợp, và một trong số hai bản sao của gen purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH và prs đã được đưa vào được thay thế cho gen nội sinh tương ứng bằng cách tái tổ hợp tương đồng, và do đó mỗi hai bản sao của gen purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH, và prs được cài xen vào chủng.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể là *Corynebacterium ammoniagenes* chứa hai bản sao của gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin là tổ hợp của gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamid formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purKE mã hóa phosphoribosyl-

aminoimidazol carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40, gen purC mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen purH mã hóa axit inosinic xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42, và gen prs mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43, và tốt hơn là *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện có thể là *Corynebacterium ammoniagenes* chứa hai bản sao của gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin là tổ hợp của purF mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 35, gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purM mã hóa phosphoribosylaminoimidazol synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 39, gen purKE mã hóa phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40,

gen *purC* mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamid synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen *purH* mã hóa axit inosinic xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42, và gen *prs* mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43, và tốt hơn là *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic, bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó sự biểu hiện của gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, và thu hồi axit 5'-inosinic từ môi trường nuôi cấy.

Theo phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic theo sáng chế, môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* có thể giống như môi trường và các điều kiện nuôi cấy thông thường được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và được chọn và điều chỉnh một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Ngoài ra, việc nuôi cấy có thể được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, ví dụ, nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy

liên tục, và nuôi cấy gián đoạn có bổ sung môi trường, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic có thể là *Corynebacterium ammoniagenes*.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic có thể là *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 hoặc *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

Theo phương án cụ thể của sáng chế, việc nuôi cấy vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* được thực hiện bằng cách nuôi cấy chủng trong môi trường thông thường chứa nguồn cacbon, nguồn nitơ, axit amin, vitamin thích hợp hoặc các nguồn tương tự trong các điều kiện hiếu khí bằng cách điều chỉnh nhiệt độ, độ pH hoặc các yếu tố tương tự.

Đối với nguồn cacbon, các hydrat cacbon như glucoza và fructoza có thể được sử dụng. Đối với nguồn nitơ, có nhiều nguồn nitơ vô cơ như amoniac, amoni clorua, và amoni sulphat có thể được sử dụng, và nguồn nitơ hữu cơ như pepton, NZ-amin, dịch chiết thịt bò, dịch chiết nấm men, nước ngâm bã ngũ cốc, sản phẩm thủy phân casein, cá hoặc bột mịn, và bánh hoặc bột đậu tương đã khử mỡ có thể được sử dụng. Ví dụ về các

hợp chất vô cơ bao gồm kali monohydro phosphat, kali dihydro phosphat, magie sulfat, sắt sulfat, mangan sulfat, và canxi cacbonat. Khi cần, vitamin và các bazơ dinh dưỡng thụ động có thể được sử dụng.

Việc nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện hiếu khí, ví dụ, bằng cách nuôi cấy lắc hoặc nuôi cấy khuấy, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28°C đến 36°C. Trong quá trình nuôi cấy, tốt hơn là độ pH được duy trì nằm trong khoảng từ 6 đến 8. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 4 đến 6 ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Cài xen gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin bằng cách sử dụng vectơ (pDZ) để cài xen nhiễm sắc thể và nhờ đó phát triển chủng tạo ra axit 5'-inosinic với hiệu suất cao

Để cài xen gen ngoại lai vào nhiễm sắc thể của chủng *Corynebacterium ammoniagenes*, vectơ tái tổ hợp trên cơ sở pDZ chứa hai bản sao liên tiếp của gen tương ứng được sử dụng. Vectơ pDZ là vectơ để cài xen nhiễm sắc thể vào vi sinh vật thuộc giống

Corynebacterium, và được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong Công bố patent Hàn Quốc số 2008-0025355 được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Fig. 1 là biểu đồ thể hiện cấu trúc của vector pDZ.

Trong các mục từ (1) đến (6) dưới đây, vector tái tổ hợp được tạo ra, trong đó vector tái tổ hợp hoạt động chức năng để cài xen gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin vào nhiễm sắc thể của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* để thu được hai bản sao của mỗi gen. Việc biến nạp bởi mỗi vector tái tổ hợp và việc chọn lọc biến nạp được thực hiện như sau.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) được biến nạp với vector tái tổ hợp pDZ chứa gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin mong muốn bằng xung điện, và tiếp theo các chủng có gen được mang bởi vector được cài xen vào nhiễm sắc thể của chúng bằng cách tái tổ hợp tương đồng, được chọn trong môi trường chọn lọc chứa 25 mg/l kanamycin. Sự cài xen nhiễm sắc thể của vector thành công được xác nhận bằng màu sắc của khuẩn lạc trong môi trường rắn (1% dịch chiết thịt bò, 1% dịch chiết nấm men, 1% pepton, 0,25% natri clorua, 1% adenin, 1% guanin, 1,5% agaroza) chứa X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-

β -D-galactosit). Tức là, các khuẩn lạc màu xanh da trời được chọn làm thể biến nạp, trong đó vectơ được cài xen vào nhiễm sắc thể. Chúng, trong đó vectơ được cài xen vào nhiễm sắc thể của nó nhờ trao đổi chéo thứ nhất, được nuôi cấy lắ (30°C, 8 giờ) trong môi trường dinh dưỡng (1% glucoza, 1% dịch chiết thịt bò, 1% dịch chiết nấm men, 1% pepton, 0,25% natri clorua, 1% adenin, 1% guanin). Sau đó, chủng đã được nuôi cấy được pha loãng theo chuỗi trong khoảng từ 10^{-4} đến 10^{-10} , và môi trường nuôi cấy pha loãng được dàn mỏng trong môi trường rắn chứa X-gal. Phần lớn các khuẩn lạc có màu xanh da trời, nhưng cũng tồn tại các khuẩn lạc màu trắng ở mức thấp. Bằng cách chọn lọc các khuẩn lạc màu trắng, chủng trong đó trình tự của vectơ được loại bỏ ra khỏi nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai được chọn. Chủng đã được chọn được nhận diện là chủng cuối bằng thử nghiệm độ nhạy với kanamycin và phân tích trình tự gen bằng PCR.

(1) Tách dòng gen purFM và cấu trúc vectơ tái tổ hợp (pDZ-2purFM)

Các gen purF và purM được nằm gần nhau trên nhiễm sắc thể của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và do đó vectơ purFM chứa cả hai gen và vùng trợ xúc tác được cấu trúc để biểu hiện cả hai gen đồng thời.

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJP2401 sản xuất axit 5'-inosinic, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được purFM, tức là, mảnh chứa purF và purM được sắp xếp liên tiếp. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với 30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen purFM chứa vùng trợ xúc tác (purFM-A, purFM-B). purFM-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1 và 2, và purFM-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 3 và 4. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ E.coli pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách dòng TOPO (Invitrogen) để thu được lần lượt các vectơ pCR-purFM-A và pCR-purFM-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzym giới hạn được chứa trong mỗi đầu của purFM-A và purFM-B (purFM-A: *EcoRI*+*XbaI*, purFM-B: *XbaI*+*HindIII*), và mỗi gen purFM được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn, *EcoRI* và *HindIII* được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2purFM trong đó hai gen purFM được tách dòng liên tiếp.

Fig. 2 thể hiện vectơ pDZ-2purFM để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vectơ pDZ-2purFM bằng xung điện, và một gen purFM được cài xen bổ sung sau gen nội sinh purFM trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen purFM được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 5 và 6 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen purFM.

(2) Tách dòng gen purNH và cấu trúc vectơ tái tổ hợp (pDZ-2purNH), tạo ra chủng được cài xen purNH.

Các gen purN và purH được nằm gần nhau trên nhiễm sắc thể của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và do đó vectơ purNH chứa vùng trợ xúc tác được cấu trúc để biểu hiện cả hai gen đồng thời.

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 sản xuất axit 5'-inosinic, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được purNH, tức là, mảnh chứa purN và purH được sắp xếp liên tiếp. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với

30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen purNH chứa vùng trợ xúc tác (purNH-A, purNH-B). purNH-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 7 và 8, và purNH-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 8 và 9. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ *E.coli* pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách dòng TOPO (Invitrogen) để thu được lần lượt các vectơ pCR-purNH-A và pCR-purNH-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzym giới hạn được chứa trong mỗi đầu của purNH-A và purNH-B (purNH-A: BamHI+Sall, purNH-B: Sall), và mỗi gen purNH được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn, *BamHI* và *Sall* được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2purNH trong đó hai gen purNH được tách dòng liên tiếp. Fig. 3 thể hiện vectơ pDZ-2purNH để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vectơ pDZ-2purNH bằng xung điện, và một gen purNH được cài xen bổ sung vào sau gen nội sinh purNH trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen purNH được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách

sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 10 và 11 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen purNH.

(3) Tách dòng gen purSL và cấu trúc vectơ tái tổ hợp (pDZ-2purSL), tạo ra chủng được cài xen purSL

Các gen purS và purL được nằm gần nhau trên nhiễm sắc thể của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và do đó vectơ purSL chứa vùng trợ xúc tác được cấu trúc để biểu hiện cả hai gen đồng thời.

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 sản xuất axit 5'-inosinic, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được purSL, tức là, mảnh chứa purS và purL được sắp xếp liên tiếp. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với 30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen purSL chứa vùng trợ xúc tác (purSL-A, purSL-B). purSL-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 12 và 13, và purSL-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 14 và 15. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ E.coli pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách

dòng TOPO (Invitrogen) để thu được lần lượt vectơ pCR-purSL-A và pCR-purSL-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzym giới hạn được chứa trong mỗi đầu của purSL-A và purSL-B (purSL-A: BamHI+SalI, purSL-B: SalI+BamHI), và mỗi gen purSL được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn, BamHI được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2purSL trong đó hai gen purSL được tách dòng liên tiếp. Fig. 4 thể hiện vectơ pDZ-2purSL để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vectơ pDZ-2purSL bằng xung điện, và một gen purSL được cài xen bổ sung vào sau gen nội sinh purSL trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen purSL được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 16 và 17 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen purSL.

(4) Tách dòng gen purKE và cấu trúc vectơ tái tổ hợp (pDZ-2purKE), thu được chủng được cài xen purKE

Các gen purK và purE được nằm gần nhau trên nhiễm sắc thể của vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium*, và do đó vectơ purKE chứa vùng trợ xúc tác được cấu trúc để biểu hiện cả hai gen đồng thời.

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJP2401 sản xuất axit 5'-inosinic, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được purKE, tức là, mảnh chứa purK và purE được sắp xếp liên tiếp. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*TM (Stratagene) được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với 30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen purKE chứa vùng trợ xúc tác (purKE-A, purKE-B). purKE-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 18 và 19, và purKE-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 20 và 21. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ E.coli pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách dòng TOPO (Invitrogen) để thu được lần lượt các vectơ pCR-purKE-A và pCR-purKE-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzym giới hạn được chứa trong mỗi đầu của purKE-A và purKE-B (purKE-A: BamHI+KpnI, purKE-B: KpnI+XbaI), và mỗi gen purKE được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn, BamHI và XbaI được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2purKE trong đó hai gen purKE được tách dòng liên tiếp. Fig.

5 thể hiện vector pDZ-2purKE để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vector pDZ-2purKE bằng xung điện, và một gen purKE được cài xen bổ sung vào sau gen nội sinh purKE trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen purKE được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 22 và 23 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen purKE.

(5) Tách dòng gen purC và cấu trúc vector tái tổ hợp (pDZ-2purC), tạo ra chủng được cài xen purC

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được purC. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*™ được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với 30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen purC chứa vùng trợ xúc tác (purC-A, purC-B). purC-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 24 và 25,

và purC-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 25 và 26. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ E.coli pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách dòng TOPO để thu được các vectơ pCR-purC-A và pCR-purC-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzyme giới hạn được chứa trong mỗi đầu của purC-A và purC-B (purC-A: BamHI+Sall, purC-B: Sall), và mỗi gen purC được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzyme giới hạn, BamHI và Sall được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2purC mà tại đó hai gen purC được tách dòng liên tiếp. Fig. 6 thể hiện vectơ pDZ-2purC để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vectơ pDZ-2purC bằng xung điện, và một gen purC được cài xen bổ sung vào sau gen purC nội sinh trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen purC được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 27 và 28 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen purC.

(6) Tách dòng gen prs và cấu trúc vectơ tái tổ hợp (pDZ-2prs), tạo ra chủng được cài xen prs

Nhiễm sắc thể được phân lập từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, và phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) được thực hiện bằng cách sử dụng nhiễm sắc thể làm khuôn mẫu để thu được prs. ADN polymeaza có độ trung thực cao *PfuUltra*TM được sử dụng làm polymeaza, và phản ứng chuỗi polymeaza được thực hiện với 30 chu trình làm biến tính ở 96°C trong 30 giây, gắn môi ở 53°C trong 30 giây, và polyme hoá ở 72°C trong 2 phút. Do đó thu được hai gen prs chứa vùng trợ xúc tác (prs-A, prs-B). prs-A được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 29 và 30, và prs-B được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 31 và 32. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng vào vectơ E.coli pCR2.1 bằng cách sử dụng kit tách dòng TOPO để thu được lần lượt vectơ pCR-prs-A và pCR-prs-B. Vectơ pCR được xử lý bằng enzym giới hạn được chứa trong mỗi đầu của prs-A và prs-B (prs-A: BamHI+SpeI, prs-B: SpeI+PstI), và mỗi gen prs được tách khỏi vectơ pCR. Sau đó, vectơ pDZ được xử lý bằng enzym giới hạn, BamHI và PstI được tách dòng bằng cách nối 3 đoạn để cấu trúc vectơ tái tổ hợp pDZ-2prs trong đó hai gen prs được tách dòng liên tiếp. Fig. 7 thể hiện vectơ pDZ-2prs để cài xen nhiễm sắc thể vào *Corynebacterium*.

Chủng sản xuất axit 5'-inosinic, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 được biến nạp với vectơ pDZ-2prs bằng xung điện, và một gen prs được cài xen bổ sung vào sau gen prs nội sinh trên nhiễm sắc thể nhờ trao đổi chéo thứ hai, để thu được chủng có tổng hai bản sao. Gen prs được cài xen liên tiếp được nhận diện bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 33 và 34 có khả năng khuếch đại các vùng nối hai gen prs.

(7) Phát triển chủng tạo ra axit 5'-inosinic với hiệu suất cao bằng cách tăng cường sinh tổng hợp purin

Tổ hợp của pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, và vectơ pDZ-2prs được cấu trúc trong các mục từ (1) đến (6) được đưa vào *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 sản xuất axit 5'-inosinic. Trình tự đưa vào vectơ được chọn ngẫu nhiên, và phương pháp đưa vào và nhận diện là giống như trên đây.

Corynebacterium ammoniagenes CJIP2401 được sử dụng làm chủng cha mẹ, và biến nạp với tổ hợp của pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, và pDZ-2prs, và tổ hợp của pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, pDZ-2purFM và pDZ-2prs để thu được *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2prs) và *Corynebacterium ammoniagenes*

CN01-0316 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2purFM + 2prs), chứa hai bản sao của gen mã hóa các enzyme chính liên quan đến con đường sinh tổng hợp purin.

Ví dụ 2. Thử nghiệm hiệu giá lên men của thể tái tổ hợp *Corynebacterium ammoniagenes*

Mỗi 3 ml môi trường hạt với thành phần sau được phân bố vào ống thử nghiệm có đường kính là 18 mm, và được khử trùng trong điều kiện áp suất. Sau đó, cấy chủng cha mẹ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, và *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 và *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 được tạo ra trong Ví dụ 1, và được nuôi cấy lắc ở 30°C trong 24 giờ để được sử dụng làm môi trường nhân giống. Mỗi 27 ml môi trường lên men với thành phần sau được phân bố vào bình cầu lắc Erlenmeyer dung tích 500 ml và được khử trùng trong điều kiện áp suất ở 120°C trong 10 phút, và mỗi 3 ml môi trường nhân giống được cấy vào đó và được nuôi cấy lắc trong khoảng thời gian từ 5 đến 6 ngày. Việc nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện 200 vòng/phút 32°C, và độ pH = 7,2.

Môi trường nhân giống và môi trường lên men có các thành phần sau.

Môi trường nhân giống: 1% glucoza, 1% pepton, 1% dịch chiết thịt bò, 1% dịch chiết nấm men, 0,25% natri clorua, 100 mg/l adenin, 100 mg/l guanin, độ pH = 7,2.

Môi trường lên men trong bình cầu: 0,1% natri glutamat, 1% amoni clorua, 1,2% magie sulfat, 0,01% canxi clorua, 20 mg/l sắt sulfat, 20 mg/l mangan sulfat, 20 mg/l kẽm sulfat, 5 mg/l đồng sulfat, 23 mg/l L-xystein, 24 mg/l alanin, 8 mg/l axit nicotinic, 45 µg/l biotin, 5 mg/l thiamin hydroclorua, 30 mg/l adenin, 1,9% axit phosphoric (85%), 4,2% glucoza, và 2,4% đường thô.

Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hiệu suất của axit 5'-inosinic được đo bằng HPLC, và lượng tích tụ của axit 5'-inosinic trong môi trường nuôi cấy được thể hiện trên bảng dưới đây.

Bảng 1

Tên chủng	OD tế bào (5 ngày sau nuôi cấy)	Hiệu suất (g/l/giờ) (5 ngày sau nuôi cấy)
Nhóm kiểm chứng (CJIP2401)	31,2	0,136
CN01-0120	31,8	0,155
CN01-0316	31,3	0,149

Lượng tích tụ của axit 5'-inosinic trong môi trường nuôi cấy được so sánh với lượng tích tụ này ở chủng cha mẹ, *Corynebacterium*

ammoniagenes CJIP2401. Do đó, ở *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 và *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316, đã thấy rằng hiệu suất axit 5'-inosinic của chúng trong mỗi giờ tăng đến 10,9 - 11,4% trong cùng điều kiện so với chủng cha mẹ, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401.

Corynebacterium ammoniagenes CN01-0316 có hiệu suất axit 5'-inosinic được cải thiện bằng cách làm tăng hoạt tính của các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (Korean Culture Center of Microorganisms - KCCM) ở địa chỉ Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, với số truy nhập KCCM 10992P ngày 19/2/2009 theo hiệp ước Budapest.

Hiệu quả của sáng chế

Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic theo sáng chế, trong đó sự biểu hiện của gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với sự biểu hiện nội sinh, có thể được sử dụng để tạo ra axit 5'-inosinic với nồng độ cao và hiệu suất cao, nhờ đó làm giảm chi phí sản xuất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vi sinh vật thuộc giống *Corynebacterium* sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó mức biểu hiện của gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được làm tăng cao hơn so với mức biểu hiện nội sinh, trong đó các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin bao gồm ribozaphosphat pyrophosphokinaza, phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza, phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II, phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza, phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza, và axit inosinic xyclohydrolaza.

2. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin còn bao gồm phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza và phosphoribosylaminoimidazol synthetaza.

3. Vi sinh vật theo điểm 1, trong đó gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin bao gồm gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purKE mã hóa phosphoribosylaminoimidazol

carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40, gen purC mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen purH mã hóa axit inosinic xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42 và gen prs mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43.

4. Vi sinh vật theo điểm 2, trong đó các gen mã hóa các enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin bao gồm gen purF mã hóa phosphoribosylpyrophosphat amidotransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 35, gen purN mã hóa phosphoribosylglyxinamit formyltransferaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 36, gen purS mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 37, gen purL mã hóa phosphoribosylformylglyxinamidin synthetaza II có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 38, gen purM mã hóa phosphoribosylaminoimidazol synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 39, gen purKE mã hóa phosphoribosylaminoimidazol carboxylaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 40, gen purC mã hóa phosphoribosyl aminoimidazol succinocarboxamit synthetaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 41, gen purH mã hóa axit inosinic xyclohydrolaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 42

và gen prs mã hóa ribozaphosphat pyrophosphokinaza có trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 43.

5. Vi sinh vật theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được biểu hiện quá mức bằng cách đưa bổ sung gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin vào tế bào hoặc bằng cách khuếch đại gen nội sinh mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin.

6. Vi sinh vật theo điểm 5, trong đó gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin tồn tại ở hai hoặc nhiều bản sao bằng cách đưa một hoặc nhiều bản sao vào tế bào, ngoài gen nội sinh tương ứng.

7. Vi sinh vật theo điểm 6, trong đó gen mã hóa enzym liên quan đến quá trình sinh tổng hợp purin được đưa vào tế bào bằng cách biến nạp nhờ sử dụng vectơ tái tổ hợp chứa hai bản sao của gen tương ứng được sắp xếp liên tiếp.

8. Vi sinh vật theo điểm 7, trong đó vectơ tái tổ hợp để đưa gen này vào vi sinh vật theo điểm 1 được chọn từ nhóm bao gồm pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC và pDZ-2prs và vectơ tái tổ hợp để đưa gen này vào vi sinh vật theo điểm 2 được chọn từ nhóm bao gồm

pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC và pDZ-2prs, các vectơ này có các bản đồ lần lượt từ FIG. 2 đến 7,

9. Vi sinh vật theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium ammoniagenes*.

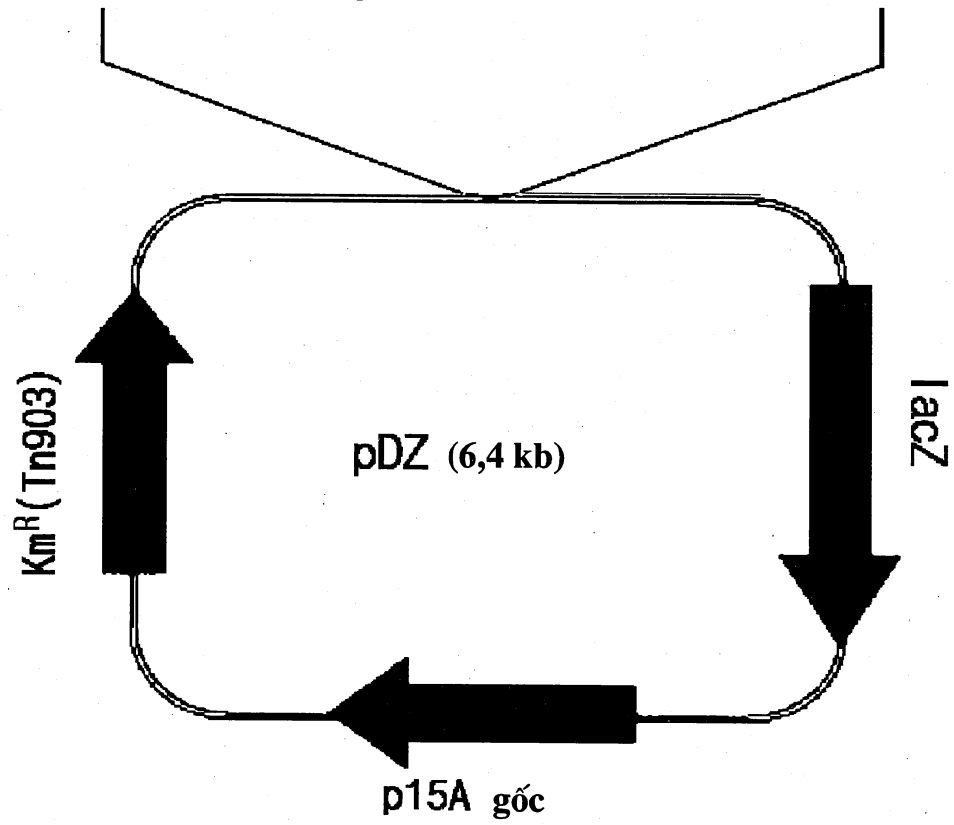
10. Vi sinh vật theo điểm 3, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2prs) thu được từ *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401.

11. Vi sinh vật theo điểm 4, trong đó vi sinh vật là *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

12. Phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy vi sinh vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và bước thu hồi axit 5'-inosinic từ môi trường nuôi cấy.

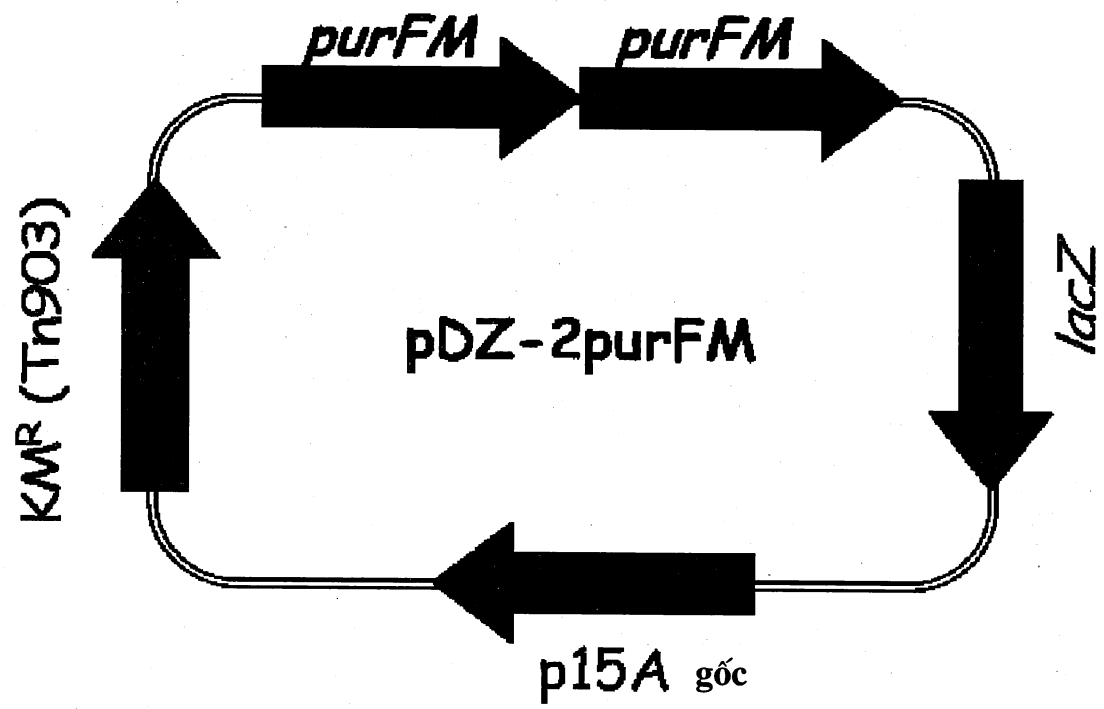
1/7

[FIG. 1]

*Bam*HI *Eco*RI *Eco*RV *Kpn*I *Sac*I *Sal*I *Xba*I *Hind*III *Nhe*I

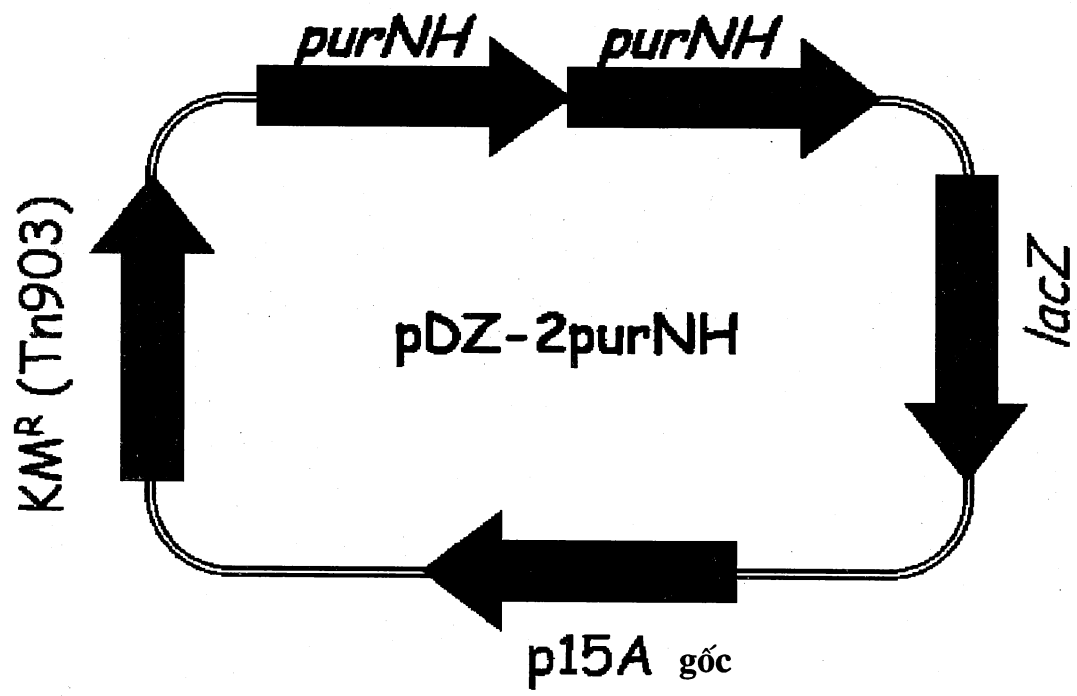
2/7

[FIG. 2]



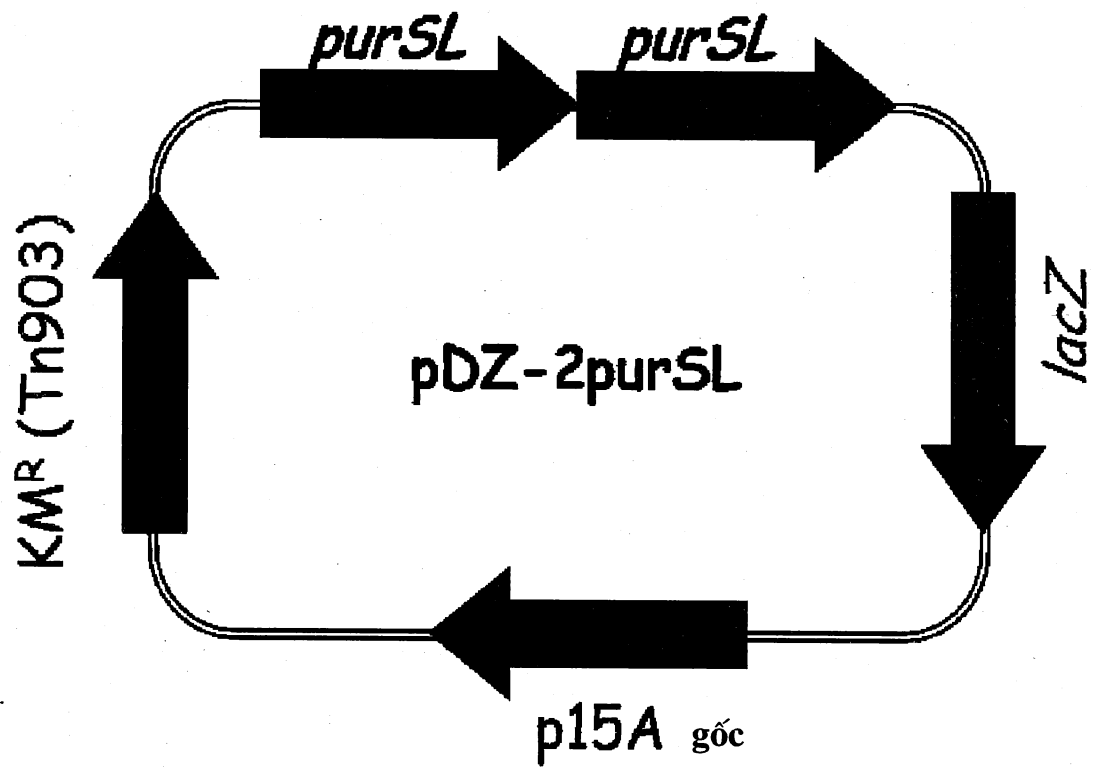
3/7

[FIG. 3]



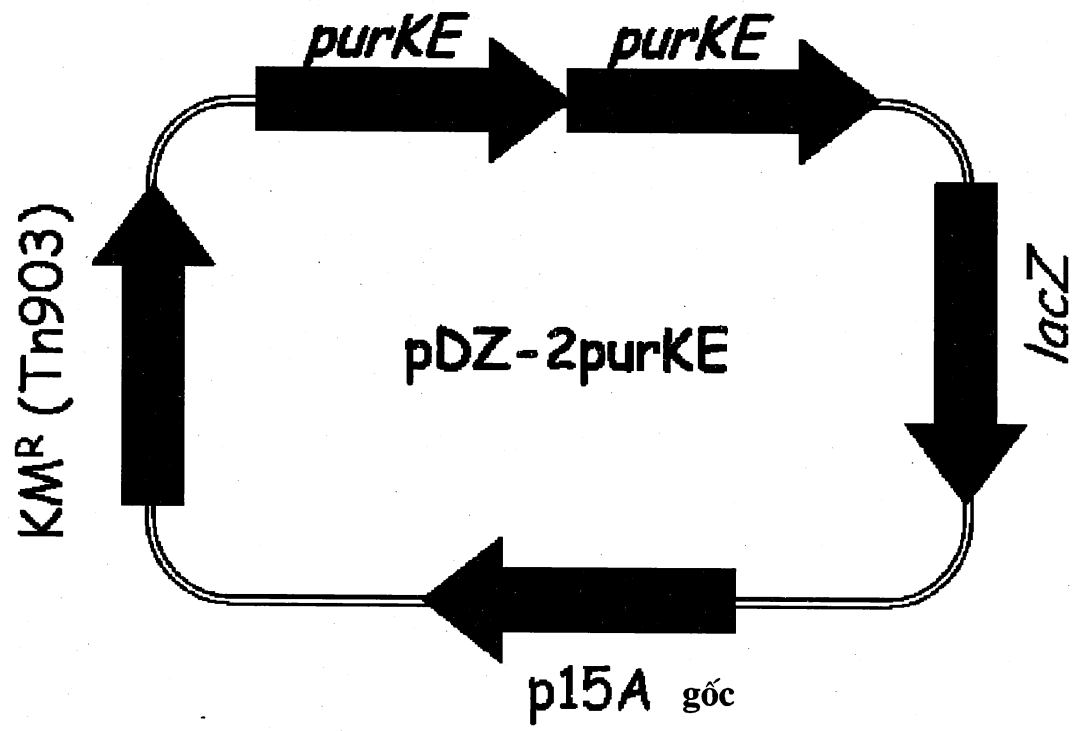
4/7

[FIG. 4]



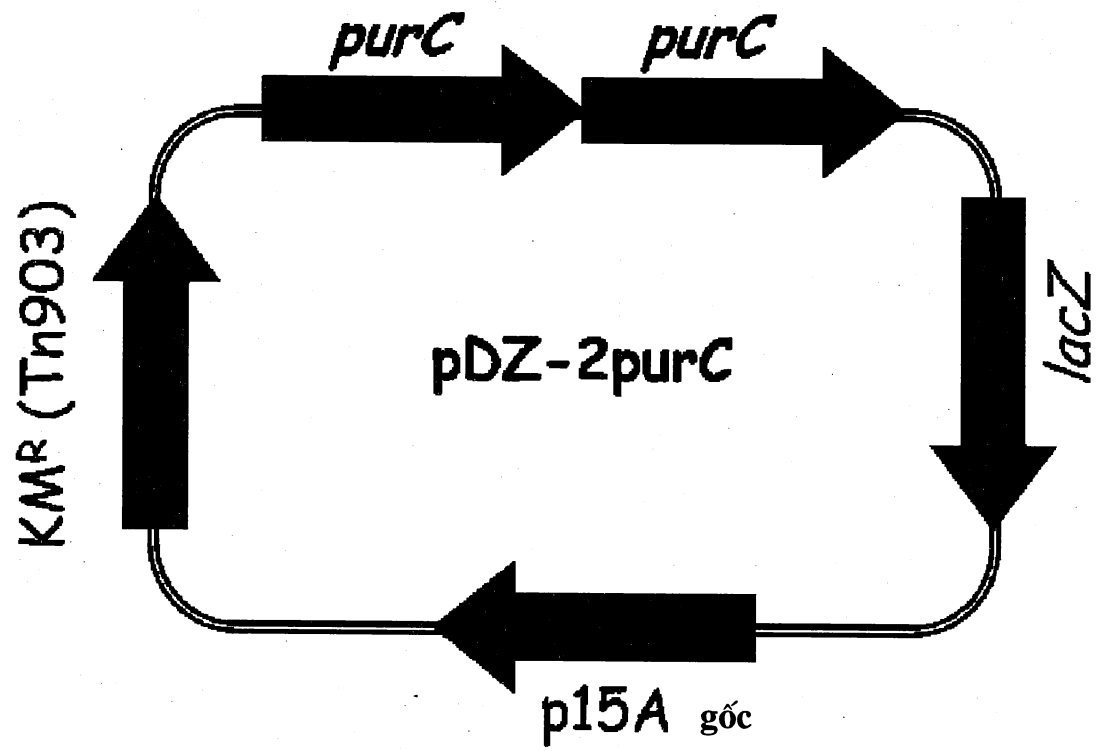
5/7

[FIG. 5]



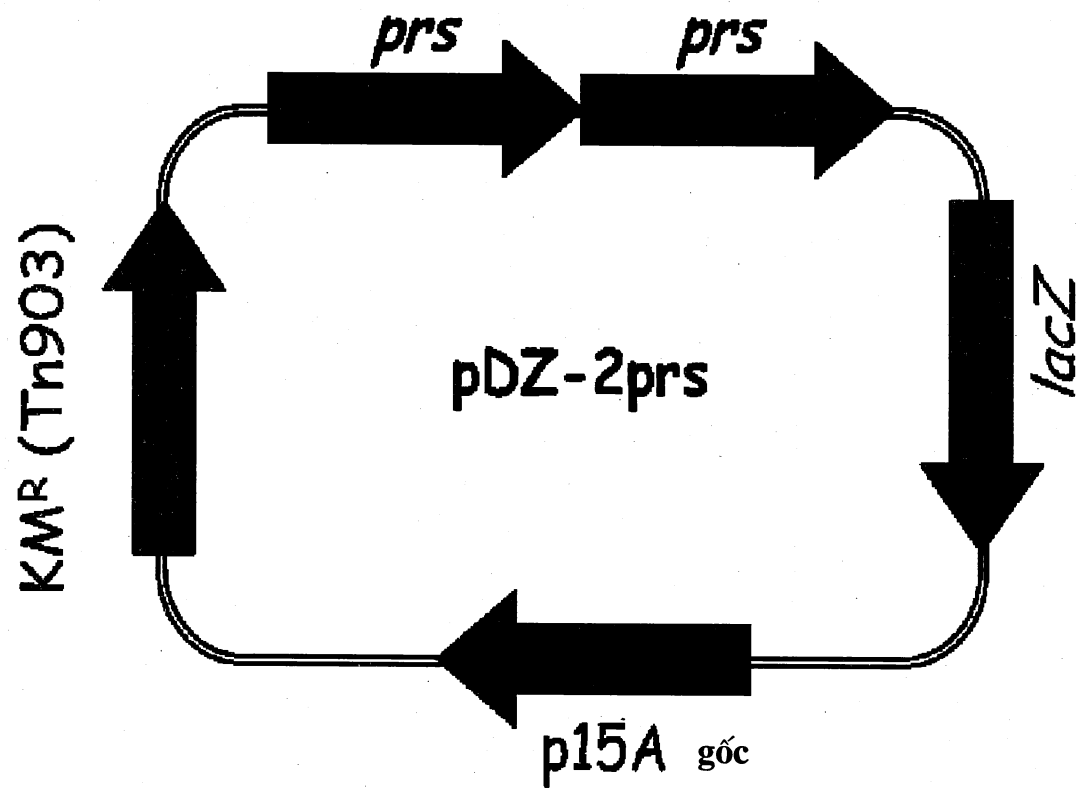
6/7

[FIG. 6]



7/7

[FIG. 7]



<110> CJ CheilJedang Coroporation
 <120> Vi sinh vật thuộc giống Corynebacterium sản xuất axit 5'-inosinic
 và phương pháp sản xuất axit 5'-inosinic
 <160> 43
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purFM
 <400> 1
 cgacgagaat tccccgaccc gcatgagatg 30
 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purFM
 <400> 2
 gtatcgtcta gagcggtagc ggtggcttcg 30
 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purFM
 <400> 3
 cgacgatcta gacccgaccc gcatgagatg 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purFM
 <400> 4
 gtatcgaagc ttgcggtagc ggtggcttcg 30
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purFM
 <400> 5
 gctatcgttt cccctgaa 18
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purFM

<400> 6
 tgattctact aagtttgc 18

<210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho purNH

<400> 7
 cgggatcccg aggcgaagac gatattgagg acag 34

<210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho purNH

<400> 8
 acgcgtcgac gtgggaaacg cagacgagaa ca 32

<210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho purNH

<400> 9
 acgcgtcgac gaggcgaaga cgatattgag gacag 35

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purNH

<400> 10
 tcgatgcctg catcttgg 18

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purNH

<400> 11
 ggcgataagg cttcgagt 18

<210> 12
 <211> 46
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purSL

 <400> 12
 gctcggatcc gcgataactca gccccagcaa cagcagaaaa tgaagc 46

 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purSL

 <400> 13
 cagcgtcgac gcagccgtcg caggcaccat cgcagcagt 39

 <210> 14
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purSL

 <400> 14
 cagcgtcgac gcgataactca gccccagcaa cagcagaaaa tgaagc 46

 <210> 15
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purSL

 <400> 15
 gctcggatcc gcagccgtcg caggcaccat cgcagcagt 39

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purSL

 <400> 16
 acttgacctc cagcccta 18

 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purSL

 <400> 17
 aagaacaacg tcggcgtc 18

 <210> 18
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purKE
 <400> 18
 acgtcaggat cccctatcgt gctttgctgt 30
 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purKE
 <400> 19
 ctctaaggta ccattggtac tagtagccgc 30
 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purKE
 <400> 20
 acgtcaggta cccctatcgt gctttgctgt 30
 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purKE
 <400> 21
 ctctaattcta gaattggtac tagtagccgc 30
 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purKE
 <400> 22
 ccagctgggg ttccggtt 18
 <210> 23
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purKE
 <400> 23
 tttcgatgcg cttcgttt 18
 <210> 24

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purC
 <400> 24
 gctcggatcc cgcagtggct gttgcgctga acatgcg 37
 <210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purC
 <400> 25
 gcaggtcgac cacggacata tcggtttgct tcacgcggg 39
 <210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho purC
 <400> 26
 gcaggtcgac cgcagtggct gttgcgctga acatgcg 37
 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purC
 <400> 27
 gagcgcttgt ccggcaagcg ttcc 24
 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2purC
 <400> 28
 ggtggttgcg gtaagaaccc ggcc 24
 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho prs
 <400> 29
 gctcggatcc ggattcccaa gcttgcttcc ggg 33

<210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho prs

 <400> 30
 cagcactagt ggcagctacc acctccgcgg ctgctg 36

 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho prs

 <400> 31
 cagcactagt ggattcccaa gcttgcttcc ggg 33

 <210> 32
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho prs

 <400> 32
 caattctgca gggcagctac cacctccgcg gctgctg 37

 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2prs

 <400> 33
 cgtacgattc atgagatctt cga 23

 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi cho 2prs

 <400> 34
 caaagtcacg ggcggtggtg g 21

 <210> 35
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1500)
 <223> purF

 <400> 35


```

gtggtgaaca ctactttccc cagcgacgtg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc      60
cgcaagagt gcggtgtctt tggcgtcttg gtccttggtg aagatgttgc gacactgacc      120
tactttggtc tgttcgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggtat cggcgtcggg      180
gatggagacc gcctcgttgt cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat tttcgatgag      240
tccattttaa attccctcca tggctccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctcgactgcc      300
ggtggcaaa agtggtcgaa tgtccagccg atgtttaata ccacctcaa tggggtagac      360
atcgctttgt gccacaacgg caacttggtg aactaccaag aactgcgca tgaagcagta      420
gctctgggac tttaccgaga gaataaaaa tccctgtcgg attccatgat catgacagct      480
ttgctggcgc acggagtcgg ggaaggcaac tctgtctttg acgccgctaa gcaactgctg      540
ccaagcatca aaggcgcttt ttgcttgacc tttaccgatg gcaagacctt gtacgccgcg      600
cgtgaccgcg acggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttgtt      660
gcttccgaaa cctgtgcgct ggatatcgtg ggcgcacagt ttatccgtga ggtagagccc      720
ggtgaactta tctctgtcaa tgaggcagga atccacagcg aaaaattcgc tgagccgaag      780
cgccagggct gcgtctttga atacgtctac ttggcacgtc cagacaccgt gatcaaaggc      840
cgcaacgttc acgcgacgcg cgtggatatt ggtcgcgcac ttgcgaaatc tcacctgcg      900
ccagaagctg acatggtcat ccccgcgcca gaatccgga acccggcagc tgttggttac      960
gcccgggaat cgggcctgac atttgcgac ggcttggtca aaaacgccta cgtgggtcga      1020
accttcattc agcccacca gaccttgccg cagctgggta ttcgcctcaa gctcaacccc      1080
ctgcgcgagg tcacgaggg caagtcaatc gttgtttag atgactctat tgtccgcggc      1140
aacacccaac gcgcgtggt gcgcagtctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgacagtg      1200
cgcattgctt caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgctcgcct      1260
ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatcctc aggtagtaac cgatgcagtg      1320
tgcaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca      1380
acgcaccaac ctatcaattc cttgtgtacc gcttgctttg atggcaacta cgaactcgga      1440
cttccgaccg ctaaccccaa tgcgtacgct gtgcgaactt tgctcagcca aaagaactga      1500

```

```

<210> 36
<211> 606
<212> ADN
<213> Corynebacterium ammoniagenes

```

```

<220>
<221> gen
<222> (1)..(606)
<223> purN

```

```

<400> 36
gtgactgaat cgccttcgca agttttgaaa gcacaagacc cgcttcaagt agtgggtgctg      60
gtatctggca ccgatcttt gctgcaaaat attatcgaca accaagatga ctctatcgg      120
gttatcaagg tagtcgcgga taagccctgc ccggggatta accgagccca agatgcaggc      180
atcgacaccg aagtcgtgct tttaggctca gaccgcgcgc agtgaacaa agaccttgct      240
gcagcgggtg gtaccgccga tgttgtggtg tccgctggat ttatgaaaat cctggggcct      300
gaattcttgg ccagctttga aggccgcaca ataaatacgc atcccgaect cctgccgtcc      360

```

tttccgggcg cgcattggagt acgggatgcg ttggcttatg gcgtgaaagt caccggctct 420
 actgtccatt ttgtggacgc gggagtcgat actggccgca tcatcgacaca acgcgcagta 480
 gagattgagg cagaagatga tgaggcaagc ttgcatgagc gcatcaaaag cgtcgaacgt 540
 gagcttatcg tgcaggctct acgcgcagcg aatgttcaag accagcagct tattattgag 600
 atttaa 606

<210> 37
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(243)
 <223> purS

<400> 37
 atggctcgtg ttgttgtaaa tgtcatgccc aaggctgaaa tcctcgaccc gcagggacaa 60
 gctgttgctc gtgcacttgg acgcctgggt gtaaacggag taagcgatgt ccgtcagggc 120
 aagcgctttg aaatcgaagt cgatgattca gtcagcgctg aagatctaga caaggctcga 180
 gcaagcttgc tggcaaacac cgtcatcgag gactacgaag ttgtagggct ggaggtcaag 240
 taa 243

<210> 38
 <211> 2277
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2277)
 <223> purL

<400> 38
 atgactgttt ccaatgacac agtagataat gcaaaggcca ctcccagct agaccagccg 60
 tgggaagaac tcggcttaaa gcaagacgaa tacgacaaga ttgtaggcat cttgggcccg 120
 cgccaaccg atgctgagct gacggtttac tccgtgatgt ggtcggagca ctgctcttac 180
 aagtcttcca agaccacact acgtacttt ggcgagacca cactgagga aatggcgctg 240
 aagattcttg ccggtatcgg tgagaacgct ggtgtcgttg acatcggcga cggtgacgca 300
 gtgaccttcc gcgtcgaatc ccacaaccac ccacacctcg tcgagcctta ccagggtgcc 360
 gcgaccgggtg ttggcggcat cgtccgcgac atcatggcga tgggtgcacg tccaatcgca 420
 gtgatggatc agctgcgctt cggcccagct gatgcccccg ataccgcacg tgttctgccg 480
 ggcgttggtt ccggcatcgg cggttacggc aactccctcg gcctgccgaa catcggcggc 540
 gagaccgtct ttgatgagtc ttatgccggc aaccacttg tcaacgcact gtgcgtgggt 600
 accttgccg tggaagacct gaagctggct tttgcttccg gtactggcaa caaggtgatg 660
 ctctttggct cccgcacggg cctcgacggc atcggcggcg tatccgtttt gggttctgct 720
 tccttcgaag aaggcgaaga gcgcaagctt cctgcagtcc aggtcggcga cccattcgcg 780
 gaaaaagtcc tcatcgaatg ctgcctggag ctctacgctg cgggcgtcgt tgcggtatt 840
 caggaccttg gtggcgggtg cctcgcatgt gcgaccttg agctggcagc agctggcgac 900
 ggcggcatgg tggtaacct ggataatgtt cactgcgtg cagagaacat gtccgccgca 960

gaaatcctgg cttccgaatc ccaggagcgc atgtgtgctg ttgtctccc agataacgtg 1020
 gagaagtcc gcgagatctg tgaaaagtgg gacgtaacgt gtgctgaaat cggatgaagt 1080
 accgataaga aagacaccta cctcgtgtac cacaacggtg agctggtagt agacgctccg 1140
 ccatcaacta tcgatgaagg cctgtgtctac gagcgcccat acgcacgccc tcagtggcag 1200
 gatgagatcc agcaggctcc ggaaattgca cgtccggaat ccttggtaca ggcattcaag 1260
 gacatggtgt cctccccagc tctgtcatcg cgtgcattta tcaactgagca gtatgaccgc 1320
 tacgtgcgcg gtaacaccgt caaggcgaag cagtctgact ccggcggttct gcgtatcaat 1380
 gagggaaactt ctcgcggtgt cgcaatttct gccgatgcct ccggtcgcta caccaagctg 1440
 gacccaaaca tgggtgcacg tttggcgctg gctgaggcat accgcaacgt tgctgtgacc 1500
 ggcgacgac catatgcggt gaccaactgc ttgaacttcg gttctccaga aacaccgcag 1560
 gtgatgtggc aattccgca ggcggttcac ggtctggctg acggttctaa ggaactgaat 1620
 atcccagtct ccggcggtta cgtctccttc tacaaccaga ctggtgatga gccaattctg 1680
 ccgacccag ttgttggcgt gctcgggtgc attgatgatg ttcacaaggc actggcacat 1740
 gacttggcg gcattgatga gcctgaaacc ctgattctgc ttggtgagac caaggaagaa 1800
 ttcggcggt ccatctggca gcaggctctc ggcgcgggcc tgcagggtct gccaccacag 1860
 gtggatctgg cgaatgaggc aaagctggcg gacttcttcg tcggcaacac ctccgttgca 1920
 gcctcccacg acctctctga gggcggtctg gctatcgcg cgtttgagat ggcgcaaaag 1980
 aacaacgtcg gcgtcgacct tgatttgagc gttgtacacg aggatgcact gaccgcactg 2040
 tttagttagt ccgcatcgcg tgttctgatt tccaccgct ctgaccacct cgatggaatc 2100
 ttgcagcgtg cttccgagct gggcattcca gctgtcgtg taggaaccac caatgattcc 2160
 ggcaacatca ccttcgctgg tgaagaagt gctaccgctg agctgcgcga ggcattgtct 2220
 gcaaccttgc caaacctgtt tggccacgct gttggcgcta attccgtagt cgaataa 2277

<210> 39
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1056)
 <223> purM

<400> 39
 atgtctgaaa atacttacgc cgcggcaggc gtcaacattg aagaaggcga ccgcgccgtt 60
 gagcttttgc ctccactggc taagcgcgct acccgctccag aggtaattggg tggactcgg 120
 ggcttcgcgg gactgtttta gctcggcgaa tacaagagc caatccttgc agctggctcc 180
 gacggcgtgg gcaccaagct cgccgttgcc caggcaatgg ataagcacga caccatcggc 240
 attgacctgg ttgcaatgtg cgtcgatgac ttggtcgtgt gtggtgctga gccactattt 300
 ctccaggact acatcgagc aggcaagggt gttccggaaa aggttgcgca gattgttgcc 360
 ggtattgctg agggctgcgt gcaggcaggc tgtgcacttc ttggtggcga gaccgctgag 420
 caccggggcg taatgaatga aaaggactac gatgtttccg ccaccgctgt cggcggtgtc 480
 gaagcagacg agcttctcgg accagacaag gttcgcgacg gcgatgtttt gattgccatg 540
 ggctcatccg gactgcactc caatggttac tccttggcgc gccacgtctt gttagagcag 600

gcaggattgc cgctcgatgg ctacatcgat gaccttggcc gcacgcttgg tgaagagctc 660
 ctggagccga cccgcattcta cgccaaggac tgcctggcgc tagtttctga gtgtgacgtt 720
 gctactttct gccacgtcac cggcgggtggc ttggcaggca acctcgagcg cgtgctacct 780
 gaaggccttg tcgcagaggt taaccgcgca tcgtggaccc cagcagcgat tttccgcacc 840
 atcgcgtctt tcggcaaggt cagcctggaa gagatggaaa agaccttcaa catgggcgtt 900
 ggcatgatcg ctatcgtttc ccctgaagac cgtgaccgcg ccttggcgat gctaactgcy 960
 cgccacgttg atgcatggga gctgggctcg gttcgcacca agaaggaaga cgacaccgca 1020
 ggtgttgtca tgcaaggtga gcactctaac ttctaa 1056

<210> 40
 <211> 1779
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1779)
 <223> purKE

<400> 40
 atgaaacgcy tgagtgaaca agcaggaaac ccagacggaa accctcaagc acatgttccc 60
 ggcatgcccg ttatcgccgt tattggtgat ggccagctag ctgcgatgat gaaaccgccc 120
 gccattgagc tcggccaatc gctgcgcctt cttgccggcg caccgcatgc ctctgcggca 180
 caagtatgcy cggtatgagt gcttgggtgat tacaccaact acgacgactt gctcaaagcc 240
 gtcgacgggt ccaccgctgt cacttttgac catgagcagc tgcctaata gacacctacc 300
 gcgttgatcg atgcaggcta taacgtgcag ccacaacctg ctgcgctgat taacgcccaa 360
 gacaaattgg ttatgcgcyg gcgcctcgcc gagctgggcy caccgctgcc gcgctttgcy 420
 ccgattgaat ctgccaaga tgcgtacgat ttttgacct tgacgtccgg gcaggtctgt 480
 ctgaaggcgc gccggggttg ctacgacgcy aaaggcgtgt ggtttccgaa taatgaatct 540
 gagctgactg ctttggcttc tgacctttcg cgccgcygcy tggccttgat ggctgaagag 600
 aaggttgcgc tggctccgcy gctttccgtg ctggtcgcgc ggaactccctc gggcgaggtt 660
 gctacttggc cgctgactga gtctgtgcag cgcaacgggt tgtgcgctga agctgtcgcg 720
 ccagccccgg gagttgacct gcagctgcag caacgcgctg agacactggg tgaaaagatt 780
 gccaccgagt tgggtgtaac tgggtgtgct gcggtagagc tttttgcatt tgcgaatgag 840
 tccggtgcyg aagatatcgc ggttaatgaa ctggcaatgc gcccgacaaa taccggccac 900
 tggaccctag atggttctgt gacctccaa tttgagcagc acctgcgcgc ggtgatggat 960
 gagccactgg gggatacatc cagccttgcc ccagtcaccg tgatggccaa cgtcttaggc 1020
 gctgacgaag acccaaagat gccaatgggc gagcgtgccc gagaagtggc gcgccgcttc 1080
 ccgcgagcca aagtccatct ctacggcaag gggcatcgcc caggccgtaa gattggccac 1140
 gtgaacctca ccggtgagga cgtagaggca acccgtcgcg atgctcgctt ggctgcggat 1200
 ttcctcgtga acgcccgtg gtctgataac tggctccgcta aatagcaaga tgtatcaaga 1260
 tatataagga aagaaatgac tgcaccgcta gttgggctca tcatgggctc tgattctgat 1320
 tggccaaccg ttgaaccagc agctgaggtt ctgcgccaat tcggtgttcc ttttgaggtg 1380
 ggcgtggtct ctgcgcaccg cagcccgga aagatgctg attacgcaa gcaagccac 1440

actcgcgcca tcaaggtgat tgttgcttgt gccggtgggg cagcgcacct accaggcatg 1500
 gtggctgcag caactccttt gccagttatt ggtattccac gtgccttgaa agatttgaa 1560
 ggtctggact ctttgctgtc tatcgtgcag atgccagctg gggttccggt tgcgaccgtg 1620
 tctatcgccg gcgctaagaa tgctggcttg ctgccatcc gtaccctggg cgtgcagtac 1680
 tcagaattgg ttgaacgcat ggccgattac caagaaaata tggccaagga agttgagcaa 1740
 aaagacgcca atcttcgcgc caagctcatg ggggactag 1779

<210> 41
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(888)
 <223> purC

<400> 41
 atgccccac agctttctga ttatcagcac gtatcctccg gcaaagtccg cgatatctac 60
 gaagtagatg acaacacttt gctcatggtg gtcaccgacc gcattctccg ctatgacttc 120
 gcactagagc cagccatccc cgataaaggc cgggttctta ccgcaaccac catgttcttc 180
 ttcgacgcca tcgatttccc gaaccatttg gcaggaccca tcgatgatgc gcggattcca 240
 gaagaagtat tgggcccagc gatcatcgtt aagaagctca acatgctgcc ctttgagtgc 300
 gttgcccgcg gttacctcac cggttccggc ttgaaggaat acaacgctaa cggcaccgtg 360
 tgccgcatcg agctgccaga aggtctggtt gaggcgtcgc gtctgccaga gccaatcttc 420
 accccagcca ccaaggcaga gcaggcgac cacgatgaaa acgtcagctt cgagcgcgtg 480
 gtgcaggacc ttggccaaga gcgcgcagag cagcttcgcg atgaaaccct gcgcactac 540
 tccgccgccg ccaagattgc cgaagaaaag ggcacatctt tggtgatac gaagtttgaa 600
 ttccggccttg attccgaagg caatctggtc ttgggcgatg aagtacttac gcctgattcc 660
 tcccgttact ggccagcaga cacctacgcg gaaggcattg tgcagcccag ctttgacaag 720
 cagtacgtgc gcaactggtt gacctcggag gaatccggtt gggatgtgga gtcggaaacc 780
 cagccgccag tgcttcccga tgacatcgtc gccgccacc gcctgcgcta catcgaggct 840
 tatgagcgct tgtccggcaa gcgtttcatc gacttcattg gcggttaa 888

<210> 42
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1551)
 <223> purH

<400> 42
 atgagtgatg accgcaagca gatcaagcgt gactaatta gcgtttatga caagacaggg 60
 ctccaagagc tcgctcgac gcttgacagc gcaggcgtag agattgtgtc caccggctcc 120
 accgccgcca agattgctga tcttggtatt aacgtcactc cggttgaatc tctcaccgga 180
 ttcccagagt gcctcgaagg ccgcgttaag acctgcacc cagcgtgca tgcgggcatt 240

ttggctgata cccgcaagcc ggatcacctt aatcagctgg aagagcttga gattgagcca 300
 ttccagttgg tcgtggttaa cctgtaccca tttaaagaga ctgtagcttc tggcgagac 360
 ttcgatgggt gcgtcgagca gattgatata ggcgttccat ccatgggccg tgctgctgcc 420
 aagaaccacc catcgggtggc ggttgttgta gaccagcgc gttacggcga catcgtgag 480
 gctgtcgctc agggcggatt cgatctggcg cagcgtcgtc agctggccgc gactgcgttt 540
 aagcacacgg cagattatga tgttgagtt tctggctggg ttgccagca gcttgccgat 600
 gactctgttg cctctgctga gcttgaaggc gacgcgctgc gttatggtga gaacctcac 660
 cagcaggctt ccatcgttcg tgaaggcacg accggtgttg ctaatgcgaa gcagctgcac 720
 ggtaaggaaa tgagctacaa caactaccag gacgcggatg ccgcatggcg cgcggttg 780
 gatcatgaac gtccatgtgt agcaattatt aagcacgcta acccttgcg tategctgtt 840
 tctgatgagt ccatcgcagc agcacacgca gcggcacacg cctgtgacct aatgtccgt 900
 ttcggtggcg ttattgcggt caaccgcgaa gtcaccaagg aaatggcaac ccaggttgc 960
 gacatcttca ccgaggtcat catcgacccg tcctacgaag atggagccgt cgagattttg 1020
 cagggaaga agaattatcg catccttggt gctgagcatg aagtaccagc agtagagtc 1080
 aaagaaatct ctggtggccg tctgtgcag gaagcagacg tttaccaggc tgagggcgat 1140
 aaggcttoga gttggacttt ggctgccgcg gaagctgcat ccgaggaaaa gctcgcgag 1200
 ctggaattcg cttggcgcgc agtacgctcg gtaaagtcca acgccatctt gttggcgcat 1260
 gaaggtgcaa ccgttggcgt ggggtatggc caggtcaacc gcgttgatc gccgaagttg 1320
 gctgttgacc gcgcgaatac tttggtgat tccgcagagc gtgctcgcg ttcgctcgca 1380
 gcatcgatg cggttcttcc attcgccgat ggcttgagg tgcctatcga tgccggcggt 1440
 tccgccgttg tccagcccgc cggtccatc cgcgatgaag aagttattgc tgccgctgaa 1500
 gcagccggta tcacatgta cttactggc acccgccact tcgcgcacta a 1551

<210> 43
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium ammoniagenes

<400> 43
 atgaccggca agatttctga tagccgcaag aatatgatgc tgttttccgg gcgcgccac 60
 ccagagttgg gtgaggctgt tgccaaggaa ttgggactg acttggttcc taccaccgc 120
 cgtgactttg cgaatggcga aatcttcatt cgcttcgaag agtccgttcg tgggtgcagat 180
 tgctttgttt tgcagtcca caccagccg ttgaacaagt ggctcatgga gcagctcatc 240
 atgattgatg cgctcaagcg tggttccgct aagcgcacga cggccatctt gccgttctac 300
 ccatatgctc gccaggacaa gaagcacctc ggtcgcgagc ctatttccgc tcgcctagt 360
 gctgacctgc tggctaccgc aggtgctgac cgcattgtgt cgggtgactt gcacaccgac 420
 cagatccagg gtttcttcga cggccctgct gatcacatgc acgccatgcc gattttgacc 480
 gagtacatcc agtccaagta ctccatcgac aacattgttg tggctctccc agatgcaggc 540
 cgcgtcaagg ttgcagaaaa gtgggcgcga gagcttggcg atgccccact ggcattcggt 600
 cacaagtctc gctccaacac tgaagcgaat aaaaccgtgt ccaaccgcgt ggtcgggtgat 660
 attgagggca aggactgcat cttgctcgat gacatgattg ataccggcgg caccatcgct 720
 ggcgcggtcc gcgtactgcg tgaagctggc gcacgttcg tcgttatcgc atgtaccac 780

ggcgttttct ctgaccccg cgcgcgagcgt ctgtctgagt gcggtgctga ggaagttatc	840
accaccgaca ccttgccctca gtccaccgag ggctgggaca acctcaccgt gctgtcgatc	900
gcgccgctgt tggcacgtac gattcatgag atcttcgaaa atggttcggt aaccaccctc	960
ttcgagtceg cgtagaaaaa tctgagagat tttctacag gataagacca aataggaccg	1020